

(19) Országkód:

HU



MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

**SZABADALMI
LEÍRÁS
SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY**

(21) A bejelentés száma: 1484/88

(22) A bejelentés napja: 1988. 03. 23.

(40) A közzététel napja: 1992. 09. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1995. 02. 28. SZKV 95/02

(11) Lajstromszám:

210 122 B

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 35/60

A 61 K 31/20

A 61 K 33/04

A 61 K 35/72

(72) Feltaláló:

A feltalálók nevük feltüntetésének mellőzését kérték,
(HU)

(73) Szabadalmas:

BIOREX Kutató-Fejlesztő Kft., Budapest (HU)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54) Eljárás a keringési rendszer és a szív tromboembolitikus állapotaira ható
gyógyászati készítmény előállítására

(57) KIVONAT

A találmány a szívre és a keringési rendszer trombo-
embolitikus állapotaira ható gyógyászati készítmények
előállítására vonatkozik. A találmány értelmében
úgy járnak el, hogy 0,5–50 tömeg%-ban szeléntartal-
mú élesztő-típusú mikroorganizmust, valamint 99,5–

0,5 tömeg% 18–24-szénatomos, legalább két ketős
kötést tartalmazó egy vagy több telítetlen zsírsavat
kívánt esetben adalékanyagokkal és antioxidánnal
elegyítenek és ismert módon gyógyszerkészítménnyé
alakítanak.

HU 210 122 B

A találmány tárgya eljárás a keringési rendszer és a szív tromboembolitikus állapotaira ható gyógyászati készítmény előállítására.

Ismeretes, hogy a C₁₈₋₂₄ ω-3 telítetlen zsírsavak előnyös biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Közülük is kiemelkedő jelentőségű az eikozapentaénsav /EPA/ és a dokozahexaénsav /DHA/. E két sav fontosságára és sokrétű biológiai hatására mutatnak rá közelményükben Dyerberg és munkatársai (*The Lancet*, 15, 117/1978).

A politelítetlen zsírsavak, ezen belül elsősorban az EPA és a DHA hiperlipidémiában és trombózisos megbetegedésekben játszott fontos szerepével kapcsolatos hatásokat írják le összefoglaló jelleggel Goodnight és munkatársai (*Arteriosclerosis* 2, 87/1982/ Review).

Hatóanyagként EPA-t és DHA-t tartalmazó gyógy-szerkészítményeket ismerte el például a 3 438 630 sz. német szabadalmi leírás elsősorban a vér koleszterinszintjének csökkentésére, továbbá az 5 808 037 és a 6 049 097 sz. japán közrebocsátási iratok szívbetegekben szenvedőknél trombus kialakulásának megelőzésére és agyérimeszesedés ellen.

Számos közlemény foglalkozik még az EPA és a DHA vérlemezkék aggregációját és így trombusképződést gátoló hatásával, így például Spencer és Caraega (*Prostagl. Leukotrienes and Med.* 23, 129 /1986/) és Knapp és munkatársai (*New Engl. Journ. of Med.* 314, 937 /1986/).

Az EPA és a DHA vírusellenes hatását ismerte a 4 513 008 sz. USA-beli szabadalmi leírás.

A halolaj aktív komponensei, így az EPA és a DHA a PG-3 sorozat bioszintézisénél prekurzorként szerepelnek, egyben gátolják az arachidonsavból kiinduló bonyolult biokémiai folyamatok láncolata, az ún. „arachidonsav-kaszkád” során keletkező káros hatású metabolitok, mint például a TXA₂ és a TXB₂ képződését.

A politelítetlen zsírsavak számos kedvező hatás mellett azzal a hátrányos patológiai tulajdonsággal rendelkeznek, hogy az emberi szervezetben spontán oxidációs mechanizmusú bomlást szennyeznek aktív aldehydek, többek közt a szervezetre káros malonaldehid keletkezése közben. Ezek az aldehydek elsősorban a kötőszövetekkel élettanilag káros reakcióba léphetnek, ami ún. „ceroid lipofuscinosis”-hoz vezethet.

Az utóbbi évtizedben kezdtek foglalkozni a kutatók a mikroelemek és nyomelemek élettani hatásával. Így ismeretessé vált, hogy a szelén az élet egyik legfontosabb, nélkülvilágított anyaga. A szelén kedvező hatása főként azon alapszik, hogy aktiválja a glutation-peroxidázt, pontosabban annak prosztetikus csoportját, amely a káros peroxidációs folyamatok legfontosabb endogén gátlója.

A szelén önmagában hatásos véryomáscsökkenő anyag, javítja a szív isémiás, hipoxiás és infarktusos állapotát, megakadályozza a központi idegrendszer ceroid lipofuscinosisát. Hatásai periodikusan, vagy kerügyulladási esetén is. Rákellenes hatása jelentős, bizonyítottan csökkenti a rák kialakulásának lehetőségét. Ezenkívül mutagén inhibitorként is alkalmazható.

A szelén nem kumulálódik a szervezetben, így pót-

lásáról állandóan gondoskodni kell. Bevitelle mostanáig főleg szervetlen vegyületek, így SeO₂ és Na₂SeO₃ alakjában történt. Hiánya májnekrózist, izomelhalást, eritrocita membrán destruktót, kötőszöveti károsodást eredményezhet, EKG elváltozásként S-T elevációt, ezenkívül kwashiorkor betegséget, sclerosis multiplexet okozhat.

A szelén biológiai hatásairól összefoglaló cikket közölnek Thressa és munkatársai (*Nutrition Review* 10 35, 7 /1977/), valamint Shamberger (*J. of Env. Path. and Tox.* 4, 305 /1980/ és Masukawa és munkatársai (*Experientia* 39, 405 /1983/).

Szerves szelén-vegyületet egyszeri preparatív szintetikus úton nyerhetünk; ilyen megoldást ismertetnek

15 például Klaiman és Günther: *Organic Selenium Compounds, Their Chemistry and Biology* /John Wiley and Sons, Inc. New York; 1973/ c. könyükben, de előállít-hatók szerves szelén-vegyületek mikroorganizmusok segítségével is. Utóbbit esetben a mikroorganizmusokat

20 szervetlen szelén-vegyülettel dúsított tápközegen nevelik. Az erre alkalmas szervezetek a szelént felveszik és azt anyagcseréjükbe vonva szerves anyagokhoz, leggyakrabban aminosavakhoz vagy zsírokhoz kötik. Ilyen eseteket ismertetnek közleményekben Danch és Chmielowsky (*Pr. Nauk. Univ. Slask Katowich* 1, 57 /1985/) és Gennity és munkatársai (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 176 /1984/).

Számos olyan mikroorganizmus ismeretes, amely képes egyes elemeket – így a szelént is – környezetéből összegyűjteni és szervezetében akkumulálni. A 30 4 530 846 sz. egyesült államokbeli szabadalmi leírás és a 60 224 451 sz. és 57 174 098 sz. japán közrebocsátási iratok szelénnel dúsított élesztőgomba előállítását írják le.

35 Az élesztő mellett egyéb mikroorganizmusok, így baktériumok, sugárgombák és fonalosgombák szelénben való dúsítását ismerte a 78 148 587 sz. japán közrebocsátási irat.

A szelén tartalmú élesztőt az 58 129 954 sz. japán 40 közrebocsátási irat szerint növényi olajokhoz keverve öregkorú megbetegedések kezelésére javasolják.

A találmány célja olyan új, a szívre és keringési rendszerre ható gyógyászati készítmény előállítása, mely lehetővé teszi a DHA és az EPA, valamint speciális mikroorganizmusok közreműködésével a szerves szelén-tartalmú természetes vegyületek előnyös tulajdonságainak egyesítését, és egyidejűleg teljes mértékben kiküszöböli a politelítetlen zsírsavak hátrányos tulajdonságait.

45 50 A találmány alapja az a felismerés, hogy a fenti cél maradéktalanul elérhető, és a ceroid lipofuscinosis folyamat kiküszöbölésére alkalmas készítmény nyerhető, ha szelén-tartalmú – humán felhasználás szempontjából nem toxikus – mikroorganizmust politelítetlen zsírsavakkal együtt alkalmazunk.

A találmányban a szelén-vegyületet a szelén-tartalmú keringési rendszerre ható gyógyászati készítmények előállítására. A találmány értelmében úgy járunk el, hogy 0,5–50 tömeg% szeléntartalmú mikroorganizmust, valamint 99,5–50 tömeg% 18–24 szénatomos,

legalább két telítetlen kötést tartalmazó zsírsavakat vagy ezek származékait kívánt esetben a gyógyszerkészítésben szokásos vivő- és/vagy hordozóanyagokkal és kívánt esetben antioxidánsnal önmagában ismert módon gyógyszerkészítményé alakítunk.

A találmany szerinti eljárással célszerűen olyan készítményeket állítunk elő, melyek eikozapentaénasavat /EPA/ és dokozahexaénasavat /DHA/, valamint szeléntartalmú élesztőt tartalmaznak.

A készítmény egyik komponenséül szolgáló C₁₈₋₂₄ ω-3 telítetlen zsírsavak alapanyagaként különböző tengeri és édesvízi halakból, így elsősorban makrélából, tőkehalból, heringból, szardíniából, tintahalból és busából, továbbá a halak májából nyerhető olajok, például a tőkehalmajolaj /csukamájolaj/ és cápamájolaj használhatók.

A halolajok az EPA-n és a DHA-n kívül nagy mennyiségben tartalmaznak telítetlen és kismértékben telítetlen zsírsavakat, valamint el nem szappanosítható komponenseket. Ezen alkotórészek eltávolítása igen fontos, hiszen a halolajokból készített gyógyászati készítmények dózisának növelése érzékenyen emelné a bevitt kalóriát, valamint a vér triglycerid-szintjét. Emellett az el nem szappanosítható alkotórészek tartalmazhatnak szteroidokat, például koleszterint, D-vitamint /annak provitaminját/ és/vagy A-vitamint. A D- és az A-vitaminok az emberi szervezetben kumulálódnak, így az ilyen vitaminokat tartalmazó készítménynek nem lehetne a kívánatos hatás eléréséhez szükséges tartós kezelést végezni. Ezért a halolajból eltávolítjuk a felsorolt alkotóelemeket, így a telítetlen és kismértékben telítetlen zsírsavakat, az el nem szappanosítható alkotóelemeket, mint például a koleszterint, az A- és D-vitamint. Ily módon a halolajban az EPA és DHA együttes mennyisége 50% fölé dúsul.

Mikroorganizmusként célszerűen olyan törzseket használhatunk, amelyek humán szempontból nem toxikusak, és így emberi fogyasztásra alkalmasak. Erre a célra legmegfelelőbbek a biotechnológiában is széles körben alkalmazott törzsek, mint például a Lactobacillus sp., Leuconostoc sp., Pediococcus sp., Acetobacter sp., Streptococcus sp., Torula sp., Kluyveromyces sp., Candida sp., Brettanomyces sp., Brevibacterium sp., Saccharomyces sp., Torulopsis sp., Pichia sp., Hansenula sp., Oidium sp., Rhodotorula sp., Trichospora sp., Penicillium sp., Rhizopus sp., Mucor sp., Monascus sp., Aspergillus sp. stb. törzsek fajai.

A találmany szerinti készítmény oxidációjának gátolására aktív tartósítószerként α-tokoferolt /E-vitamin/, glutiont vagy hagyományos antioxidiánsokat, mint például butil-hidroxi-toluolt célszerű használni.

Vivő- és hordozóanyagként a gyógyszerkészítésben szokásos anyagokat, mint például laktózi, keményítőt vagy magnézium-sztearátot alkalmazhatunk.

⁴ farmakológiai vizsgálatok szerinti készítmény efektivitási károsító mellékhatásuktól való mentességét igazolták, mert a patkánymáj mikroszomális enzimrendszerében használtos dózis százszoros mennyiségenél sem tapasztaltunk elváltozást. A készítménnyel történő kezelés szignifikáns módon csökkenti a kontrollhoz

viszonyítva a szervezetben felhalmozódó lipofuscinc mennyiségét. A találmany szerinti készítménnyel Wistar nőstény patkányokon végzett 6-hetes vizsgálatok alapján egyéreelmű trombocita aggregáció gátlást tárpasztaltunk.

A készítmény optimális hatásos napi dózisa /75 kg-os átlagos testtömegre számolva/ 2 g. Az olaj-komponens átlagosan 22% EPA-t és 43% DHA-t tartalmaz. Az élesztőpor grammonként átlagosan 40 µg szelént tartalmaz.

A találmany szerinti készítmény főbb előnyei a következők:

1. Egyesítő az EPA és a DHA, valamint a szelén és az élesztő előnyös tulajdonságait.

2. Kiküszöböli az ismert halolajtartalmú készítmények azon káros hatásait, melyeket a telített lipoid komponensek, például szterinek, valamint az A- és D-vitamin tartalom okozhat.

3. Kiküszöböli a politelítetlen zsírsavak fogyasztására esetén fellépő „ceroid lipofuscinosis” lehetőségét.

4. A szelént természetes anyagként mikroorganizmusban, mint pl. baktériumban, gombában, élesztőben feldúsítva tartalmazza, speciális mikroorganizmussal együtt adagolt szelén jobban felszívódik, és kedvező hatását előnyösebben fejt ki.

5. A szerves szelén mikroorganizmusokban így elsősorban élesztőben ipari méretekben, fajlagosan nagymennyiségen ér olcsón állítható elő.

6. Kedvező gyógyászati hatást fejt ki atopikus zavarok esetén, és ekcéma, asztma, allergiás tünetek, allergiás rhinitis és/vagy atopikus összefüggésű zavarok, például migrén, Crohn-féle betegség, fekélyes colitis, otitis media, nefrotikus szindróma, cukorbetegség preventív kezelésére is felhasználható. Különösen alkalmas a keringési rendszer zavarai, annak apoplexiás megnyilvánulásai, trombo-embolitikus állapotok, így agyvérzés, infarktus, fiatalkorúak Keshan-szindrómája kezelésére, valamint a rendellenes állapotok kialakulásának megelőzésére.

7. A találmany szerinti készítményhez alkalmazott ω-3 politelítetlen zsírsavakat az 1. példában leírtak szerinti, a szelénnel dúsított mikroorganizmust pedig a 2–6. példák szerint állíthatjuk elő. A 7–9. példák a találmany szerinti gyógyászati készítmények előállítását szemléltetik.

1. példa:

24 kg makrélá olajat 60 °C-on feloldunk 16 liter metanolban 50–60 °C közötti hőmérsékleten, keverés közben 8 kg 40%-os NaOH oldatot csepeltetünk hozzá, majd az eleget 60 °C-on tartva további 45 percig kevertetjük. Mintegy 60 °C hőmérsékleten 20 kg 15%-os sósavat adunk az oldathoz. A fázisokat elválasztjuk, majd a szerves fázist még 10 kg 15%-os sósavval, mintegy 180 liter formában csapvízzel semlegesítjük. Az így kialakult fázisokat ismét elválasztjuk. Az olajos fázishoz 100 liter acetont adunk, felmelegítjük mintegy 45 °C-ra, és hozzáöntünk 30 liter vízben feloldott 3,8 kg LiOH×H₂O-ot. Fél óra keverés után 60 éjszakán át állni hagyjuk, majd leszűrjük, és az acetó-

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a szív és a keringési rendszer tromboembolitikus állapotaira ható gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 0,5–50 tömeg%, előnyösen 5–35 tömeg%, célszerűen 15–25 tömeg% szelén-tartalmú élesztő-típusú mikroorganizmust, valamint 99,5–50 tömeg%, előnyösen 95–65 tömeg%, célszerűen 85–75 tömeg% 18–24 szénatomos, legalább két telítetlen kötést tartalmazó egy

esetben a gyógyszerkészítésben szokásos vivő- és/vagy hordozóanyagokkal és kívánt esetben antioxidánssal önmagában ismert módon gyógyszerkészíténné alakítjuk.

5 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy telítetlen zsírsavként tengeri halak olajából extra-hált zsírsavakat használunk.

10 3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy telítetlen zsírsavként 5,8,11,14,17-eikozapentaénsvat és 4,7,10,13,16,19-dokozahexaénsvat használunk.

nos szűrletet bepároljuk. Körülbelül 8 kg 15%-os só-savval megsavanytjuk és hexánnal háromszor kirázuk, majd a hexámos fázist bepároljuk. A tisztítási művelet során végig N₂-atmoszférában dolgozunk. Így 6,4 kg tisztított halolajat nyerünk.

Az így tisztított makrélaojal 1 kg-ját 60 °C-on hozzácsapjatjuk 3 kg karbamid 9 liter metanollal készített oldatához. Az elegendőt 2 órán át ezen a hőmérsékleten keverjük. Lehűlés után éjszakán át mélyhűtőben -10 °C-on állni hagyjuk, majd leszűrjük, és a szűrletet bepároljuk. A bepárolt anyaghoz 2,5 liter 1:1 hígítású sósavat öntünk, és 15 percig keverjük. Hexánnal kirázuk, a hexámos fázist vizivel semlegesre mossuk, Na₂SO₄-tal száritjuk, majd bepároljuk. Így 0,34 kg ω-3 telítetlen zsírsavat kapunk. Jódszám: 315; EPA-tartalom: 24%; DHA-tartalom: 42%.

2. példa:

5-literes üveg palackokba 2-2 l sterilizált malátavonatos folyékony táptalajt öntünk, és glükózzal 13% dúsítjuk 5 µg/ml nátrium-szelenitet teszünk hozzá, majd beoltjuk *Saccharomyces cerevisiae*-vel. Levegőzetetéssel 32 °C-on 72 óráig neveljük. A 48. órában újabb 5 µg/ml nátrium-szelenitet adunk a tenyészethez.

Szűrés után a sejteket desztillált vizivel többször átmossuk, majd 68–70 °C-on száritjuk. Az anyagot mikronizáljuk, majd atomabszorpciós módszerrel meghatározzuk a Se-tartalmat. A kapott érték 300 µg/g.

3. példa:

500 ml-es Erlenmeyer-lombikokba 100 ml élesztőkivonatos folyékony tápoldatot töltünk steril körilmények között, majd 5 µg/ml mennyiségi Na-szelenitet teszünk bele, és beoltjuk *Aspergillus sojae* gombával. 28–30 °C-on rázatjuk a tenyészeteket. A tenyészés 3. napján újabb 5 µg/ml Na-szelenitet teszünk a kultúrába. 5 nap elteltével után a szárazanyagot kiszűrjük, mosunk, majd a 2. példa szerinti módon száritjuk. Mikronizálás után a minta műszeresen meghatározott Se-tartalma 300 µg/g.

4. példa:

A 3. példával azonos módon alkalmazzuk a *Torulopsis utilis* nevű élesztőt. A tenyészés során nyert mikrobatömeg Se-tartalma 120 µg/g.

5. példa:

A 3. példa szerinti módon elkészített tápoldaton *Streptococcus thermophilus*-t nevelünk 45 °C-on. A nevelési és kinyerési periódus után a mikroba-por Se-tartalma 420 µg/g.

6. példa:

A 3. példával azonos módon neveltünk *Lactobacillus mesenteroides* baktériumfajt. Ez esetben a táptalajt 1% glükózzal és 2% kalcium-karbonátval is kiügetszjük. A kapott baktérium 300 µg/g Se-t tartalmaz.

7. példa:

150 g 65%-os dúsított makrélaojalhoz /EPA-tarta-

lom: 24%, DHA-tartalom: 42%/ 10 g Se-élesztőport keverünk /Se-koncentráció: 260 µg/g élesztőpor/. A keveréket homogenizáljuk. A homogenizáratot 0,1% E-vitaminnal tartósítjuk. A kapott hatóanyagot lágy zselatin gyöngykapszulába vagy lágy zselatin kapszulába töltjük, és buborék-csomagolással szereljük ki.

8. példa:

Mindenben a 7. példa szerint járunk el, azzal az eltéréssel, hogy az alábbi kiindulási anyagokat használjuk: 400 g 65%-os dúsított tőkehalmájolaj, melynek EPA tartalma 22%, DHA-tartalma 43%; 100 g élesztőpor 120 µg/g Se-tartalommal és 0,4 mg E-vitamin. A homogenizáratot 500 mg hatóanyag befogadására alkalmas kapszulába töltjük.

9. példa:

Ismert gyógyszerészeti eszközökkel és eljárással az alábbi összetételű tablettakat állítjuk elő:

| | |
|--|----------|
| EPA-ra és DHA-ra nézve dúsított tőkehalmáj olaj, mely 0,1% E-vitamin tartaltságot tartalmaz (DHA-tartalma: 43%, EPA-tartalma: 22%) | 200,0 mg |
| Se-élesztő (Se-koncentráció: 150 µg/g élesztőpor) | 86,0 mg |
| Laktóz | 140,0 mg |
| Keményítő | 60,0 mg |
| Polivinil-pirrolidon | 3,5 mg |
| Magnézium-sztearát | 3,5 mg. |

30 Kívánt esetben a tablettakat dragsírozó gépen cukorral vagy más anyaggal vonjuk be.

A trombocita aggregáció gátló hatást Wistar albinó nőstény patkányok 10-es csoportjain 6 hetes p. o. kezeléssel vizsgáltuk. Az állatok I. csoportja 67% 35 zsírvav-származék és 33% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g) keverékét, a II. csoport 94% zsírvav-származék és 6% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g), a III. csoport 50% zsírvav-származék és 50% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g) keverékét kapta. A IV. (kontroll) 40 csoport 67% fiziológiai sóoldat és 33% élesztő (szélen-mentes) keveréket kapta.

A 6 hetes kezelést követően a vena cava inferiorból vért vettünk, a vérmintákat 3,5%-os Na-citráttal összekvertük, centrifugáltuk és a kapott, trombocita-dús plazmában, ADP különböző koncentrációval trombocita aggregációt idéztünk el. Azt a minimális ADP-koncentrációt, melynél az aggregáció jelentkezik, ADP kúszób-koncentrációinak nevezük. Ennek átlagos értéke (\bar{X}) a kontroll-csoportban 11,1 µ; a találmany szerinti 50 kombináció hatására ez jelentősen emelkedik, mint azt az alábbi táblázat mutatja:

| | \bar{X} (µM) |
|------------------------|----------------|
| I. csoport | 64,5 |
| II. csoport | 52,3 |
| III. csoport | 88,5 |
| IV. (kontroll) csoport | ...,.. |

A trombocita aggregáció gátló hatás jelentős, és 50–94% zsírvav (vagy zsírvav-származékot) és 33–50% élesztő (Se-tartalmú élesztő) tartalmazó kombináció esetében megfelelően bizonyított.